

# BIOCHIMICA

## - MACROMOLECOLE INFORMAZIONALI -

### LA BIOCHIMICA NEL TEMPO:

- Pasteur → organismi viventi e processi
- 1887 Bucher → mostrano la fermentazione in estratti cellulari
- descrizione della glicolisi
- descrizione del ciclo di Krebs
- isolamento di frazioni mitocondriali
- sequenza amminoacidica di una proteina
- 1953 → Watson e Crick: struttura a doppia elica del DNA
- anni 1960 → Perutz: struttura tridimensionale di una proteina
- codice genetico
- tecniche di clonaggio di DNA
- progetto Genoma umano
- era post-genomica: genomica funzionale
- proteomica (espressione delle proteine nei singoli tessuti)

**BIOCHIMICA** → studia e descrive la struttura, l'organizzazione e le funzioni della materia vivente in termini molecolari.

- 1- struttura chimica dei componenti
- 2- interazioni a dare complessi sopramolecolari e strutture complesse
- 3- estrazione dell'enel dall'ambiente
- 4- mantenimento dell'informazione, suo utilizzo e passaggio alle generazioni successive
- 5- crescita, differenziamento, invecchiamento

### CAMPI della BIOCHIMICA:

- biochimica strutturale
- studio del metabolismo (vie metaboliche e regolazione)
- biochimica dell'informazione genetica

BIOCHIMICA ↔ BIOLOGIA MOLECOLARE

- ricerca medica: patologia, nutrizione, fisiologia
- farmacologia
- microbiologia
- biotecnologie
- ambiente, ecc

## ELEMENTI del CORPO UMANO:

ELEMENTO	%
H	66
O	25.5
C	9.5
N	1.4

Inoltre sono presenti altri elementi in piccole tracce come: P,S,Ca,Cl,K,Mg,Na,Co,Cu,Fe,Mn,Zn.

Enel di legame Kcal/mole	Legami covalenti
~ 800	Si—O
~ 500	C—F
~ 400	C—H
~ 380	C—OH
~ 370	C—NH <sub>2</sub>
~ 320	C—C
~ 250	C—I
~ 150	C—NO

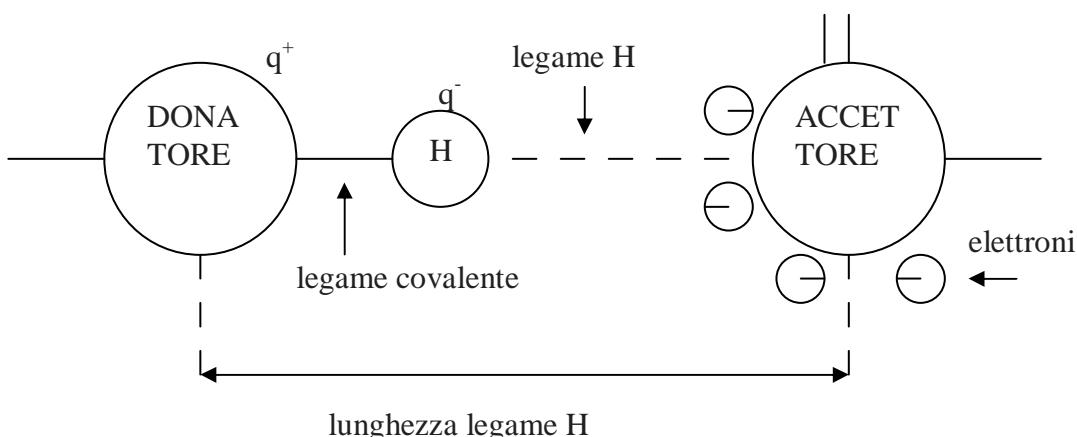
Vi sono anche altri legami importanti tra i quali:

- *legami H*
- *Forze di Van der Waals*
- *Interazioni elettrostatiche*
- *Legami non – covalenti*

Il **complesso sopramolecolare** è un’insieme di proteine diverse che interagiscono tra loro con legami deboli.

## IL LEGAME H:

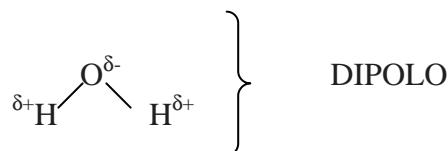
- Interazione tra un atomo di H legato covalentemente a un gruppo donatore (–OH; =N—H) ed una coppia di e- spaiati di un gruppo accettore (O=C—; =N—)
- Importante l’elettronegatività dell’atomo del gruppo donatore:  
F(4)>O(3.5)>N(3.0)>C(2.5)>H(2.1)
- Il legame H ha un parziale carattere covalente e l’enel di legame è di ~ 20kJ/mole
- È altamente direzionale (orizzontale, nuclei paralleli, se si presenta qualche angolatura l’enel diminuisce)



**LUNGHEZZA del LEGAME H:** distanza tra il nucleo del donatore e quello dell'eccettore (nm).

La lunghezza per far sì che tra un atomo di O e di H si crei un legame debole (Van der Waals), occorre una distanza di 0.26nm mentre x gli altri casi:

<b>Donatore-----Accettore</b>	<b>Lunghezza legame</b>	<b>Commenti</b>
--O—H-----O—H	0.28 ± 0.01	Nell'H <sub>2</sub> O
--O—H-----O=C=	0.28 ± 0.01	Tra H <sub>2</sub> O e altre molecole
=N—H-----O—H	0.29 ± 0.01	Tra H <sub>2</sub> O e altre molecole
=N—H-----O=C=	0.29 ± 0.01	Proteine e acidi nucleici
=N—H-----N=	0.31 ± 0.02	Proteine e acidi nucleici
=N—H-----S=	0.37	Relativamente raro

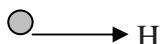
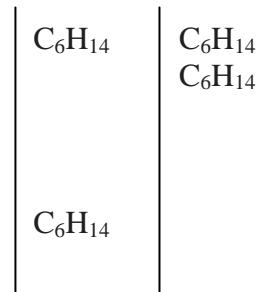
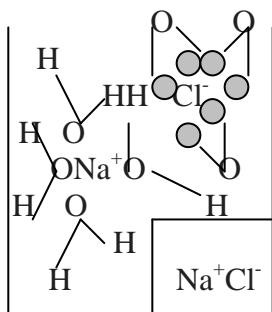


Ciascuna molecola di H<sub>2</sub>O può formare 4 legami H con una media di 3.4 legami H x molecola e nell'acqua liquida si formano e disfano continuamente legami, mentre quando l'H<sub>2</sub>O è solida si formano 4 legami.

## RUOLO DELL'H<sub>2</sub>O NEI SISTEMI BIOLOGICI→

### Proprietà dell'H<sub>2</sub>O:

- punto di fusione 0°C
- punto di ebollizione 100°C
- densità massima a 4°C = 0.997
- alta viscosità, tensione superficiale, coesione
- elevata costante dielettrica (78.54 ~ 80)
- elevato calore specifico
- comportamento come solvente: molecole *idrofile, idrofobiche, antipatiche*
- forma legami H coi soluti
- interagisce elettrostaticamente coi soluti carichi
- gas polari poco solubili in H<sub>2</sub>O (N<sub>2</sub>; CO<sub>2</sub>; O<sub>2</sub>)
- le molecole non polari tendono ad unirsi per attrazione idrofobia
- le molecole polari vengono idratate



L'H<sub>2</sub>O presenta una struttura ordinata e stabile a CLATRATO  
Le molecole idrofobiche diminuiscono l'entropia

### INTERAZIONI DI VAN der WAALS:

- sono importanti se in gran numero
- enel di legame di ~ 4kJ/mole
- la distanza tra i 2 nuclei deve essere = alla somma dei raggi di Van der Waals
- se 2 atomi sono legati covalentemente il raggio è minore

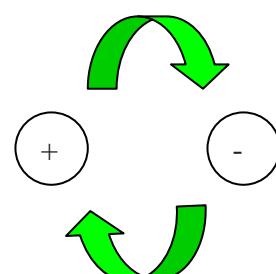
ATOMI	RAGGIO (nm)
H	0.12
O	0.14
N	0.15
C	0.17
S	0.18
P	0.19

### INTERAZIONI CARICA – CARICA:

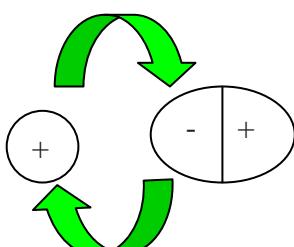
Legge di Coulomb  $\rightarrow F = K \frac{q_1 * q_2}{\epsilon * r^2}$

$\epsilon$ =costante dielettrica  
F positiva: repulsione  
F negativa: attrazione

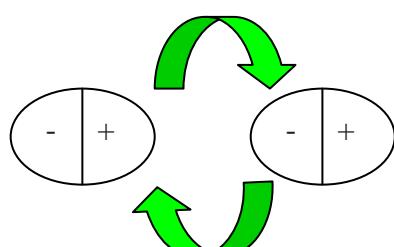
r	F
++	+
--	+
+-	-



### CARICA – DIPOLO: CARICA – DIPOLO indotto



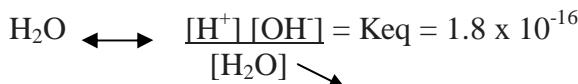
### DIPOLO – DIPOLO:



Le molecole antipatiche presentano una parte idrofobia ed una idrofila.

### GLI EQUILIBRI IONICI:

Il comportamento di tutte le macromolecole dipende dallo stato di IONIZZAZIONE:



$$55.5 * 1.8 \times 10^{-16} = 1 \times 10^{-14} \text{ M}^2 = K_w = [\text{H}^+] [\text{OH}^-] \text{ (prodotto di ionizzazione dell'acqua)}$$

$$\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$$

### ACIDI – BASI – SOLUZIONI TAMPONE:

**Acido** → donatore di  $\text{H}^+$

**Base** → accettore di  $\text{H}^+$

**Acido (e base) debole** →  $\text{AH} \rightleftharpoons \text{A}^- + \text{H}^+$ ; la costante di dissociazione è:  $K_a = \frac{[\text{A}^-] [\text{H}^+]}{[\text{AH}]}$

$$\text{pK}_a = -\log K_a$$

### EQUAZIONE DI HENDERSON – HASSELBACK:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{AH}]}$$

$\text{PK}_a$  = al valore di Ph per il quale si ha che  $[\text{A}^-] = [\text{AH}]$

Se  $K_a > 1$  allora la sostanza è fortemente dissociata

Se  $K_a < 1$  allora la sostanza è debole cioè indissociata

Quando  $K_a = 1$ , ovvero quando  $[\text{A}^-] = 1$ , allora  $\text{pH} = \text{pK}_a$



Una base coniugata carica ( $\text{A}^-$ ) si idrata prima di ( $\text{A}$ )

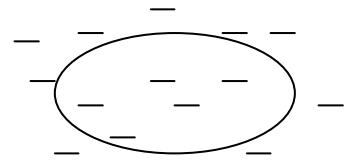
$$K_a = \frac{[\text{A}^-] [\text{H}^+]}{[\text{AH}]} \quad [\text{H}^+] = K_a * \frac{\text{AH}}{\text{A}^-} \quad -\log[\text{H}^+] = -\log K_a + \log \frac{\text{A}^-}{\text{AH}}$$

L' $\text{H}_2\text{O}$  fa da schermo alla riassociazione, se si abbassa la costante dielettrica (con solventi organici), il  $\text{pK}_a$  si alza e l'acido diventa + debole (si associa).

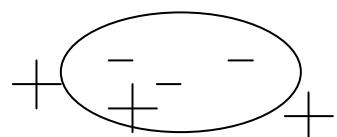
### AMMINOACIDI e PROTEINE:

Il **p.I.** → valore di pH a cui la molecola ha carica netta = 0:  $\frac{\text{pK}_a + \text{pK}_b}{2}$

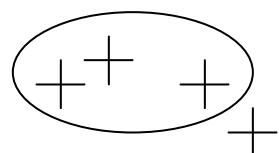
A pH elevato la proteina è solubile (deprotonata; solo cariche negative)



Al punto isoelettrico si hanno aggregati proteici



A pH basso la proteina è solubile (protonata; cariche positive)



## FUNZIONI BIOLOGICHE:

### Enzimi e proteine di:

- trasporto (membrana, ormoni)
- riserva (piante, cotiledoni, ecc.)
- contrattili (muscoli)
- strutturali (struttura cellulare)
- difesa (anticorpi)
- regolatrici (ormoni)

### Oligopeptidi, polipeptidi, proteine

### Gruppi prostetici

La funzione di una proteina dipende dalla sua sequenza aa che è fondamentale x la sua struttura tridimensionale e funzioni:

- proteine con funzioni diverse hanno sequenze diverse
- proteine mutate → malattie genetiche
- proteine funzionalmente simili da specie diverse hanno sequenze simili
- 20 – 30% delle proteine umane sono polimorfe

Il **p.m.** della proteina è = alla somma dei **p.m.** degli aa (che di media è ~110)

Il *citocromo* è una proteina presente in tutti gli organismi (nell'uomo nei mitocondri) e alcuni aa sono mutati ma altri sono rimasti = perché sono fondamentali x svolgere la funzione.

## STRUTTURE delle PROTEINE:

- 1) primaria
- 2) secondaria
- 3) terziaria
- 4) quaternaria

### 1) struttura primaria →

la sequenza va dall'N-terminale al C terminale

AA non – polari	GLY – ALA – VAL – LEU – ILE – PRO
AA polari	SER – THE – CYS – MET – ASN – GLN
AA aromatici	PHE – TYR – TRP
AA positivi	LYS – ARG – HIS
AA negativi	ASP – GLU

Gli aa esistono in natura per la maggior parte nella forma L – aa

I **peptidi** → reazione endoergonia ( $\Delta G = 10\text{ kJ/mole}$ ) si ha l'eliminazione di una molecola di  $\text{H}_2\text{O}$ ; il legame avviene tra il gruppo amminico di un aa e il gruppo carbossilico del secondo aa.  
Le proteine potrebbero idrolizzarsi solo in presenza di un catalizzatore.  
Il legame peptidico è planare e ha carattere di doppio legame e ha un parziale carattere polare.

### SCHELETRO dei PEPTIDI →

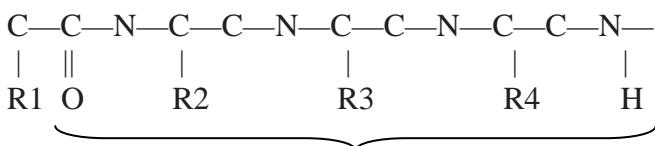
Secondo Pauling i requisiti dei polipeptidi sono:

- lunghezze legame e angoli fisse
- 2 atomi non possono avvicinarsi + del raggio di Van der Waals
- legami non covalenti stabilizzano la struttura (legami H)
- alfa – elica
- foglietti – beta

### 2) struttura secondaria →

#### ALFA – ELICA:

- destrorsa (dal basso verso l'alto in senso antiorario)
- 3.6 residui per giro
- 13 atomi x giro
- passo per residuo (distanza tra 2 residui sull'asse): 1.5 Å
- passo per giro: 5.4 Å (3.6 \* 1.5)
- rotazione x residuo: 100°
- unità ripetitiva: 18 residui
- tenuta insieme da legami H tra l'ossigeno del gruppo carbonilico e l'N del gruppo amminico
- legami H paralleli all'asse dell'elica
- carattere dipolare (cariche residue +: NH<sub>2</sub> e cariche residue -: COO)
- le catene laterali sono all'esterno dell'elica



#### STABILITÀ ALFA – ELICA:

- sequenza aa
- interazioni tra catene laterali degli aa (residui carichi – e residui carichi +) destabilizza
- forma e dimensioni catene laterali: disturbi
- interazioni tra catene laterali spaziate di 3 aa o 4 aa (stabile o no a seconda dei R)
- presenza di residui di PROLINA destabilizza

L'alfa – elica antipatica presenta una metà idrofobia e metà idrofila, inoltre può ripiegarsi grazie a dei **loop** e assumere anche delle strutture a *coiled – coil*.

#### FOGLIETTI – BETA:

- legami H giacciono sul piano del foglietto
- le catene laterali R → una volta sopra e una volta sotto il piano alternativamente
- filamenti antiparalleli o paralleli
- nei filamenti antiparalleli possono esserci anse (loop x cambiare direzione) o alcuni gruppi C=O e NH non fanno legame ma interagiscono con l' $\text{H}_2\text{O}$

- nei filamenti antiparalleli i legami H sono lineari; in quelli paralleli sono obliqui

**MOTIVO** → è una struttura supersecondaria

- elica – loop – elica
- mano E – F (E – F hand)
- il  $\text{Ca}^{++}$  si lega con aa ASP – GLU – gruppo C=O del loop
- nella proteina a cui è isolata questa struttura → 5° e 6° elica (E e F)
- struttura a forcina (*harpin – structure*) con filamenti antiparalleli
- struttura a chiave greca (filamenti antiparalleli)
- beta – alfa elica – beta

I MOTIVI → semplici combinazioni di pochi elementi di struttura 2° con uno specifico arrangiamento spaziale.

LOOP: struttura con + di 2 aa e mobile

BETA – TURN: struttura rigida e definita

**GERARCHIA STRUTTURALE:**

- struttura primaria (sequenza aa)
- struttura secondaria (alfa – elica; beta – sheet; loop)
- struttura supersecondaria (motivi semplici)
- struttura terziaria (domini compatti formati da diversi motivi)
- struttura quaternaria (diversi peptidi con diversi domini che interagiscono tra di loro)

**Dominio**: unità fondamentale di struttura terziaria; una catena (o parte di essa) che può indipendentemente ripiegarsi in una struttura terziaria stabile. Sono unità funzionali.

Proteine fatte da 1 o + domini ad esempio nella sintesi di acidi grassi si ha 1 proteina con 7 domini (nei mammiferi) e 7 proteine con 7 domini (nelle piante)

**COME PREVEDERE la struttura dalla SEQUENZA:**

<b>Alfa – elica</b>	ALA – CYS – LEU – MET – GLU – GLN – HIS – LYS
<b>Beta – sheet</b>	VAL – ILE – PHE – TYR – TRP – THR
<b>Ripiegamento</b>	GLY – SER – ASP – ASN – PRO

**COME un peptide può assumere la sua forma 3D:** è scritta nella sequenza aa. Se si denatura e poi rigatura → nella sequenza aa c'è l'informazione x raggiungere la forma 3D. La struttura può essere assunta grazie ai *legami H*, *legami ionici*, *interazioni di Van der Waals*.

Una proteina passa dallo stato disordinato ad uno ordinato per cui si ha un aumento di ENTROPIA.

**PROTEIN FOLDING:**

- $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$
- aumenta l'ordine nella struttura della proteina
- l'entropia diminuisce
- quindi occorre  $\Delta H$  negativo o un altro aumento di entropia
- $\Delta H$  è negativo se hanno luogo interazioni favorevoli tra gruppi della proteina: *interazioni elettrostatiche* (ponti salini, pH); *legami H intermolecolari*, *interazioni di Van der Waals*
- la sfavorevole entropia del folding è compensata dal contributo favorevole dell'entalpia
- effetto idrofobico → porta ad un aumento dell'entropia complessiva del sistema(proteina +  $\text{H}_2\text{O}$ )

**1900** → riscoperta di Mendel

**2001** → sequenziamento genoma umano:

- FASE 1: teoria cromosomica dell'eredità
- FASE 2: basi molecolari dell'eredità
- FASE 3: decifrazione del codice genetico
- FASE 4: decifrazione geni e menoma

**GENOMA** → insieme dell'informazione genetica in una cellula

### **PROGETTO INTERNAZIONE GENOMA UMANO:**

Obiettivi principali:

- mappe genetiche e fisiche dettagliate
- individuazione di tutti i geni umani (50 – 100000)
- sequenziamento completo del menoma umano (3 miliardi di paia di basi o 3000 Mb; Mb=mega base – pair)
- definizione aspetti etici, sociali e legali

Obiettivi collaterali:

- mappatura e sequenziamento di organismi modello come *E.Coli*, *Saccaromiches cerevisiae*, *arabidopsis thaliana*, *C.elegans*)

### **PREMESSE ESSENZIALI:**

- investimenti (centinaia di milioni di dollari/anno)
- costituzione di organismi internazionali

### **AVANZAMENTI TECNOLOGICI:**

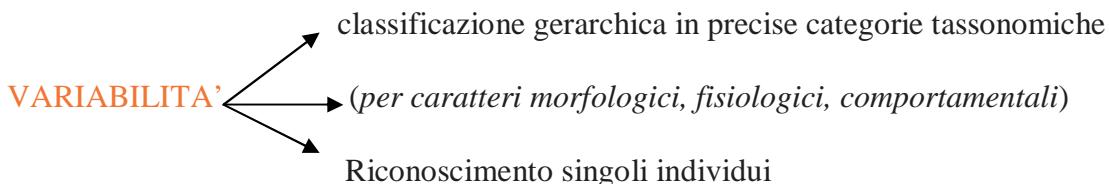
- chimica → sequenziamento e sintesi del DNA
- ingegneria → sequenziatori automatici, robotica
- informatica → banche dati, algoritmi
- biologia molecolare → marcatori molecolari, vettori di clonazione, sistemi di trasformazione

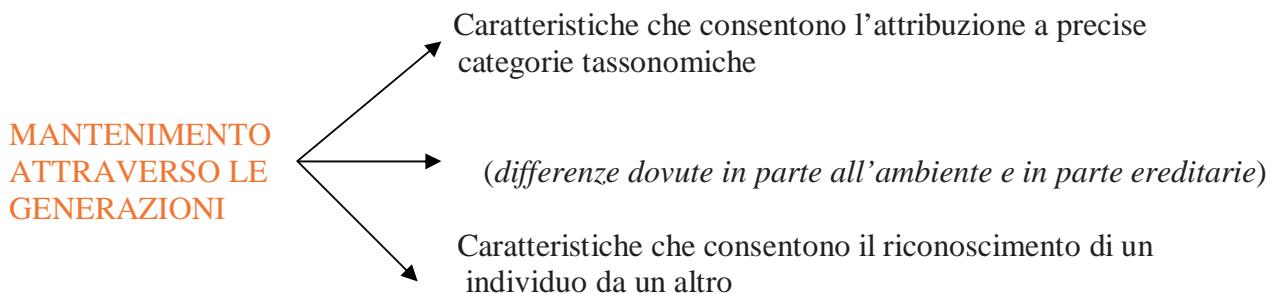
### **GENOMI SEQUENZIATI:**

599 virus e viroidi; 205 plasmidi; 185 organelli; 31 eubatteri; 2 archea; 1 fungo; 2 animali; 1 pianta

### **CARATTERI GENERALI GENOMA UMANO:**

- 22 coppie di cromosomi omologhi + 1 coppia di cromosomi sessuali (X e Y)
- complessità: 3200Mb (1 Mb = 1 milione di base – pair)
- 30 – 40.000 geni che codificano prodotti proteici
- dimensioni medie di un gene: 30.000 Bp (base – pair) di cui solo  $\frac{1}{5}$  codificante
- $\frac{1}{3}$  del menoma è trascritto
- solo 1.5% codifica per proteine



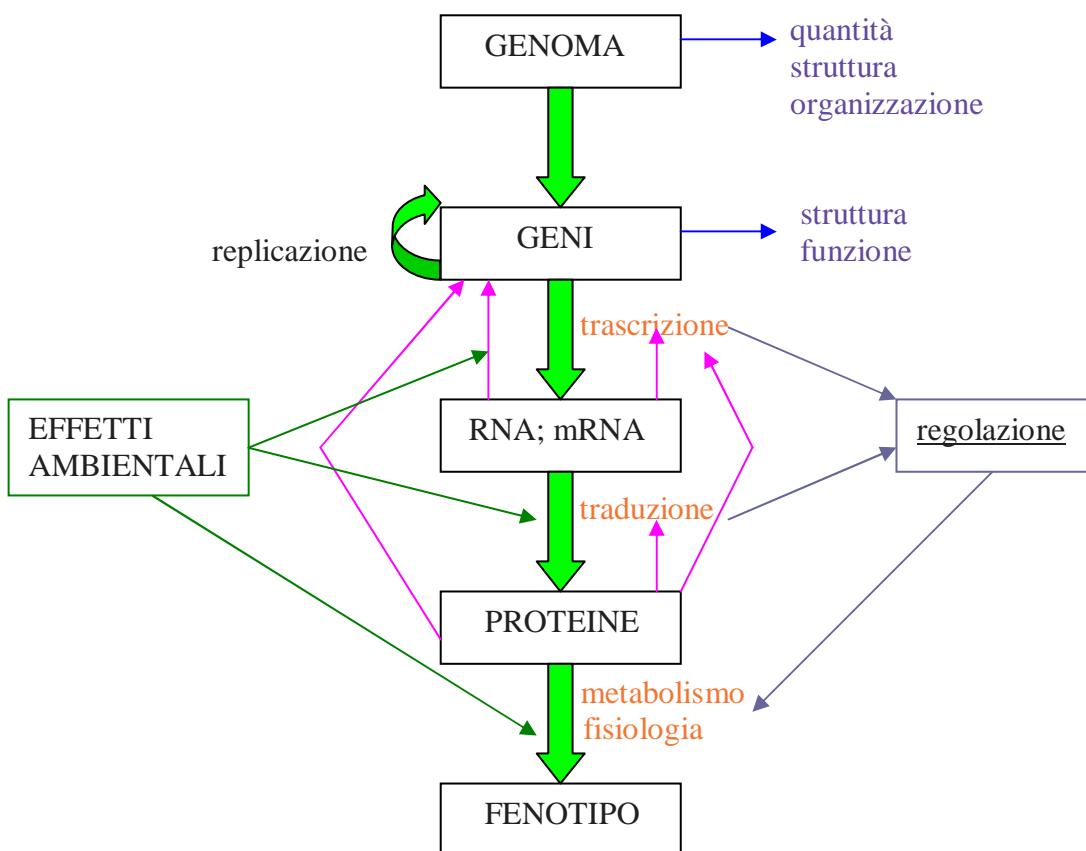


La capacità di trasmettere le proprie caratteristiche biologiche risiede ne **MATERIALE GENETICO**. Occorrono però requisiti essenziali x rispondere alla funzione:

- contenere tutta l'informazione
  - replicarsi esattamente
  - avere una struttura stabile
- } **DNA**

Il materiale genetico quindi è il DNA che contiene l'informazione e tutte le caratteristiche dell'individuo e ne assicura la trasmissione che avviene secondo 2 meccanismi:

- la **mitosi** → da uno zigote a tutte le cellule e si ha la *costanza* del DNA in tutte le cellule
- la **meiosi** → da una generazione alla successiva e si ha il *riassorbimento* genetico: gameti ≠



**ESPERIMENTO di GRIFFIN** → virus R e S

**AVERY, Mc Lead, Mc Carthy** → frazionamento → estratto → ac. Nucleici → solo frazione contenente DNA → trasformazione: AVIRULENTO → VIRULENTO; controprova: estratto + proteasi + Rnasi → effetto invariato; estratto + Dnasi → non + efficace; interpretazione → DNA induce mutazioni specifiche ed è il materiale genetico.

**ESPERIMENTO di HERSEY e CHASE** → batteri su terreno radioattivo x dimostrare che il DNA è il materiale ereditario.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Se  $\Delta G$  è negativo la proteina passa dallo stato disordinato ad ordinato; la perdita di struttura porta ad una perdita di funzione.

**NUCLEAZIONE** → formazione iniziale di segmenti ad alfa – elica e beta – sheet (denaturata)

**CONSOLIDAMENTO** → strutturale e ripiegamento 3°

**RIARRANGIAMENTI** → finali, proteina nativa.

### COMPONENTI ACIDI NUCLEICI:

- polimeri
- monomeri sono i nucleotidi → base azotata + gruppo fosfato + zucchero (ribosio)
- la base è legata al C1
- i gruppi fosfato sono in posizione 5 – 3
- nucleotidi → DNA e RNA
- **NUCLEOSIDE** → base + zucchero (non c'è il fosfato)
- Il DNA è un eteropolimero
- Ribosio/desossiribosio = pentosi in cui al C1 si attacca la base; il C2 è la differenza tra ribosio (H) e desossiribosio (OH); il C3 e C5 legano il P

### BASI AZOTATE:

#### **PIRIMIDINE** →

- anello eterociclico di atomi C e N
- citosina (DNA – RNA)
- uracile (RNA)
- timina (DNA)
- 1 sito di legame tra base e zucchero
- 3 siti di legame tra base e base

#### **PURINE** →

- 2 anelli fusi di 5 e 6 elementi
- adenina: 2 legami H
- guanina: 3 legami H

### POLIMERIZZAZIONE:

- legame fosfo – diesterico
- zucchero – fosfato – zucchero → ossatura della catena polinucleotidica
- 3 gruppi fosfato: alfa; beta; gamma
- il gruppo P alfa si lega al C3 del nucleotide già stato incorporato
- è presente un *nucleotide trifosfato* perché occorre enel x la polimerizzazione e lipera P—P (*pirofosfato*)
- il P alfa fa da ponte ai 2 pentosi

### ROSALIND FRANKLIN →

- cristallizzazione del DNA
- analisi di diffrazione del DNA a raggi X

- elica destrorsa
- passo di 3.4 Å ( $1^\circ = 1 \times 10^{-10}$  m)

### PRESUPPOSTI WATSON e CRICK (1953) →

- 1) caratteristiche fisiche dell'analisi di rifrazione ai raggi X
- 2) regola di Erwin Chagraff: -
  - la quantità delle diverse basi non è fissa (in specie diverse si hanno proporzioni diverse)
  - rapporto *purine/pirimidine* è sempre  $\sim = 1$
  - rapporto A/T e G/C è sempre  $= 1$

### STRUTTURA →

- antiparallela
- ossatura P—zucchero
- legami tra basi complementari
- i legami tra le basi sono legami H

### CONSEGUENZE →

- 1) ipotesi meccanismo di replicazione
- 2) chiave di lettura sulla natura molecolare dell'informazione genetica
  - sequenza di basi
  - meccanismi di variazione
  - ricadute metodologiche → ibridazione molecolare

### MODELLO DI REPLICAZIONE:

- 1) semiconservativo (no – rottura elica)
- 2) conservativo (no – rottura elica)
- 3) dispersivo (l'elica si frammenta)

### ESPERIMENTO di MESELSON e STAHL (1958)

Il modello giusto è quello semiconservativo

### MECCANISMI DI REPLICAZIONE:

#### **dogma centrale:**

- 1) i geni si perpetuano come sequenze di acidi nucleici (DNA o RNA)
  - 2) la loro funzione è attraverso la produzione di proteine
    - struttura
    - funzione
    - sviluppo
    - riproduzione
- } dipendono dal tipo di proteine

occorrono:

- precursori → nucleotidi trifosfato
- DNA stampo
- Proteine → enzimi che catalizzano la sintesi

**5' → 3': replicazione e trascrizione**

La POLIMERIZZAZIONE avviene in direzione 5' → 3'

I precursori sono i nucleotidi trifosfato

Occorre un nucleotide con un OH in 3' libero

### REPLICAZIONE:

- 1) DNA da replicare
- 2) Precursori: nucleotidi 3P
- 3) ENZIMI di replicazione:
  - **dna – polimerasi** → sintetizzano DNA ex-novo; complessi enzimatici grandi; vari tipi; altre attività enzimatiche (controllo)
  - **enzimi** che mettono DNA – polimerasi in condizioni di operare
  - **enzimi** che completano l'opera

### PRODUZIONE DI TERMINAZIONE 3'OH:

Un enzima inizia a sintetizzare una piccola sequenza di nucleotidi da un elica del DNA → vengono fatti piccoli RNA tramite la **dna – primasi**:

Il **PRIMING** → inizio replicazione → **elicasi**: separa le 2 liche in modo che i legami H non si riformino.

Siccome il DNA a singola elica è debole, occorrono delle particolari proteine: **single strand binding proteins** che tengono aperto il DNA.

Dopo ciò arriva la DNA-PRIMASI.

Nell'**elica leading** la polimerizzazione procede fino in fondo

Nell'**elica lagging** frammenti di OKASAKI

Dopo occorre eliminare il primer e unire i pezzi tramite la **dna – ligasi**

### REPLICAZIONE DEL DNA:

- meccanismo molto accurato
- selezione del materiale
- svolgimento del DNA
- sintesi
- controllo di bozze (senso opposto: da 5' → 3' a 3' → 5')
- *ricadute metodologiche*: strumenti di manipolazione (amplificazione, sintesi, clonazione)

### ORGANIZZAZIONE DEL DNA:

**Cromatina** = DNA + proteine

### CARATTERISTICHE CHIMICO – FISICHE ACIDI NUCLEICI:

- assorbanza luce UV lunghezza 260nm
- proteine max assorbienza a 280nm
- rapporto: O.D. (optical density) 280/260 → < 1.8: + bassa è meglio è

### DENATURAZIONE DEL DNA:

- da doppia elica a molecola di singola elica (random coil)
- calore → aumento di T → dissociazione delle eliche e + alcali forti
- **temperatura di MELTING (Tm)** → punto di mezzo della T per la denaturazione
- denaturando il DNA aumenta l'assorbanza
- non tutti i DNA hanno la stessa Tm perché il legame C—G (C + G) ha + legami H e quindi la Tm è maggiore
- il DNA → **RINATURAZIONE** (dipende dalla lunghezza e dalla concentrazione) formazione dei legami tra basi complementari

### **METODO DI SANGER**

### **SINTESI PROTEICA**

### **RIBOSOMI**

## SINTESI PROTEICA:

DNA → trascrizione → RNA → traduzione → POLIPEPTIDE

### tRNA:

- adattore
- singola elica a forma di trifoglio x appaiamenti intramolecolari
- anticodone
- sito accettare dell'aa in 3'
- aa legato covalntemente

### RIBOSOMI:

- 2 subunità = 70S (- Mg<sup>++</sup>; + Mg<sup>++</sup>)  $\longleftrightarrow$  50S e 30S
- siti della traduzione
- particelle con rRNA e proteine ribosomiali
- coefficiente di sedimentazione = **SVEDBERG (S)** che dipende da massa e forma
- > massa > tasso di sedimentazione > S
- alti e lunghi 200 A
- 2 tRNA all'interno
- la subunità + piccola interagisce con l'mRNA; poi si posiziona la subunità superiore con 2 siti attivi x la tRNA; la lettura procede da SINISTRA a DESTRA ; le 2 subunità si dissociano e si libera l'mRNA che può essere tradotto + volte e poi degradato

### TRASCRIZIONE:

- 1 elica di DNA funge da stampo x RNA
- RNA sintetizzato ha sequenza = alla complementare
- **Elica STAMPO** → RNA
- **Elica CODIFICANTE** → sequenza = all'RNA prodotto
- L'enzima → **rna – polimerasi (5' → 3')**
- I tipi di RNA → *rRNA*; *tRNA*; *mRNA*; *smRNA* (small o piccolo RNA che codifica il segmento d'innesto per la replicazione: il primer)

### RNA POLIMERASI:

- la trascrizione: **rna – polimerasi**
- è un complesso enzimatico
- interagisce con altre proteine detti fattori trascrizionali
- un tipo di RNA – polimerasi → un tipo di RNA
- DNA dipendenti
- **Rna – pol 1** → rRNA
- **Rna – pol 2** → mRNA
- **Rna – pol 3** → tRNA e sRNA

### DEFINIZIONI:

- **elica codificante** o "senso" (coding strand) → stessa sequenza mRNA 5'p\_\_\_\_\_OH 3'
- **elica stampo** o "antisenso" (template strand) → dirige la sintesi dell'mRNA mediante appaiamento delle basi complementari 3'OH\_\_\_\_\_p5'
- **mRNA** → molecola stampo x sintesi proteica
- **rapporto lineare mRNA – peptide** 5'p\_\_\_\_\_OH3' e NH<sub>3</sub>-----COOH

### mRNA:

- +lungo della proteina
- presenta pezzi che non vengono tradotti

- NUCLEOTIDE + 1 → nucleotide sull'elica codificante che è il 1° NT della sequenza mRNA e costituisce lo STARTPOINT
- La sequenza prima dello STARTPOINT → regolazione del gene x trascrizione ed è detta PROMOTRICE
- UPSCREAM → a monte: il promotore
- DOWNSCREAM → a valle
- La posizione vicino allo STARTPOINT → PROSSIMALE e man mano → DISTALE
- In posizione DISTALE a valle → segnale → TERMINAZIONE
- RNA maturo è + corto della sequenza del gene che lo codifica
- Ibridazione gene – rna → ci si aspetta una doppia elica ma avanzano porzioni lunche a singola elica
- ESONI → sequenze trascritte e tradotte
- INTRONI → sequenze trascritte ma non tradotte perché vengono eliminate nel nucleo con lo SPLICING
- Alla terminazione dell'mRNA → tanti AAAAAAAAAA → coda di poly (A) inserita dopo la trascrizione: POLY(A)TAIL; solo mRNA e indica la terminazione
- 5'CAPPING → dopo la trascrizione: aggiunta di una G terminale in 5' in direzione opposta; legame trifosfato 5'—5'; diversi gradi di mutilazione (dopo il capping); ad opera della guanilin – transferasi

**TRASCRIZIONE → POLY(A)TAIL → CAPPING → METILAZIONE → SPLICING**

## - CINETICA ENZIMATICA -

### **ENZIMI:**

- CATALIZZATORI → aumenta la V di una reazione chimica senza subire trasformazioni durante l'intero processo
- PROTEINE → gli enzimi sono proteine di struttura 3° o talora 4°
- SUBSTRATO → sostanza su cui agisce l'enzima [S]
- INALTERATO nel processo e NON influiscono sull'equilibrio della reazione ma ne aumentano la velocità
- ALTAMENTE SPECIFICI → un enzima è specifico per un substrato
- TAMPONE → mantengono costante il pH del sangue:  
 $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$  ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ /  $\text{HCO}_3^-$ )
- NUMERO DI TURNOVER → n° di molecole di S trasformate in P in **1 sec** da 1 molecola di E quando è nelle migliori condizioni (saturato)

### **NOMENCLATURA – CLASSIFICAZIONE:**

- nome del substrato + **-asi**
- 4 numeri → codice
- 6 classi:

CLASSE	REAZIONE
1	Ossidoriduttasi
2	Transferasi
3	Idrolasi
4	Liasi
5	Isomerasi
6	Ligasi

## STRUTTURA:

- 1 o + proteine globulari
- possono funzionare tal quali (solo struttura proteica) o solo con **COFATTORI** (ioni metallici o molecole organiche)
- **OLOENZIMA = APOENZIMA** (enzima solo proteico) + **COFATTORE**
  - ↳ Proteina coniugata
- COFATTORI ORGANICI o COENZIMI → NAD, FAD, ATP, CoASH

## SITI ATTIVI:

- l'enzima si lega al substrato → E-S (complesso ATTIVATO)
- il S si trasforma in P e l'E diventa libero
- $E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$
- E è + grande di S → solo alcune regioni dell'E sono catalitiche
- SITI CATALITICI o ATTIVI → struttura 3° della proteina e i residui amminoacidici responsabili dell'attività sono: -OH; -SH; -NH<sub>2</sub>; -COOH; e quelli in grado di fare ponti H
- la > parte degli aa degli enzimi → favoriscono l'**ORIENTAMENTO E-S**
- MODELLO di FISCHER → chiave – serratura: l'E ha conformazione rigida complementare a quella del S
- MODELLO dell'ADATTAMENTO INDOTTO → l'avvicinarsi di S a E modifica la struttura di E (in modo reversibile) e migliora la reciproca aderenza

## ATTIVITA' ENZIMATICA e PARAMETRI REGOLATORI:

- azione catalitica dell'enzima → scelta del percorso con < Eatt. (anello di attivazione)
- fattori chimico – fisici che influenzano l'azione catalitica dell'enzima sono:
  - 1) [S]
  - 2) [E]
  - 3) pH
  - 4) T
  - 5) inibitori
  - 6) attivatori

### 1) [S]:

- dipendenza della V di reazione dalla [S] → equazione di Michaelis-Menten:  $V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$
- alla V<sub>max</sub> tutti i siti sono saturati
- **K<sub>m</sub>** (costante di Michaelis) → [S] alla quale la V di reazione è =  $\frac{1}{2} V_{max}$ 
  - affinità dell'E nei confronti di S
  - valori piccoli di K<sub>m</sub> → E alta affinità per S

### 2) [E]:

- proporzionalità diretta tra V di una reazione enzimatica in funzione di [E]

### 3) pH:

- modificazione della dissociazione dei residui aa del SITO ATTIVO (la sua forma) e della dissociazione dei gruppi del substrato (il suo riconoscimento)
- pH OTTIMALE di funzionamento → **4 – 9**

### 4) T:

- un aumento di T (temperatura) → crescita esponenziale della V di reazione di un enzima senza però raggiungere la DENATURAZIONE

### 5) INIBITORI:

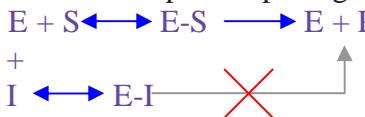
- rallentare la V di una reazione enzimatica e possono essere IRREVERSIBILI o REVERSIBILI

- **INIBIZIONE IRREVERSIBILE** → le molecole dell'I si legano irreversibilmente ai residui del sito attivo → E-I:  $E + I + S \rightleftharpoons E - I + S$

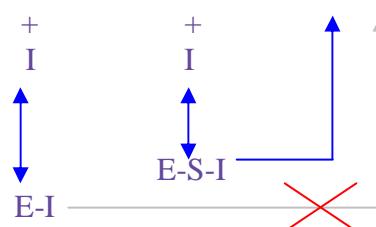


- **INIBIZIONE REVERSIBILE** → può essere COMPETITIVA o NON-COMPETITIVA

- **INIBIZIONE REVERSIBILE COMPETITIVA** → molecole di S e I sono strutturalmente simili e competono per legarsi reversibilmente al sito attivo:

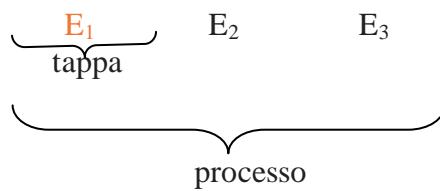


- **INIBIZIONE REVERSIBILE NON-COMPETITIVA** → le molecole di I possono legarsi con E o ES in un sito diverso da quello catalitico: **allostero** → deformazione dell'enzima e S interagisce + difficilmente con E. In questo caso indipendentemente da [S] la V di reazione si abbassa:  $E + S \rightleftharpoons E - S \xrightarrow{} E + P$



### REGOLAZIONE OPERATA DA ENZIMI:

ENZIMA REGOLATORE → opera su una tappa irreversibile e fra le prime di un processo metabolico:  $A \xrightarrow{} B \rightleftharpoons C \rightleftharpoons P$

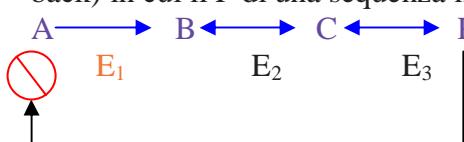


ENZIMI ALLOSTERICI → proteine 4° che hanno  $\xrightarrow{\text{SITO ATTIVO}}$   $\xrightarrow{\text{SITO ALLOSTERICO}}$  in cui si inseriscono **modulatori** positivi o negativi del sito attivo catalitico e lo stabilizzano.

Se sono regolati da modulatori diversi da S → ENZIMI AD EFFETTO ETEROTROPO

Se sono regolati da modulatori uguali ad S → ENZIMI AD EFFETTO OMOTROPO

Un esempio di REGOLAZIONE ALLOSTERICA OMOTROPA → inibizione retroattiva (feedback) in cui il P di una sequenza metabolica inibisce l'azione del primo E della sequenza stessa:



EFFETTO COOPERATIVO → l'entrata di una molecola di S in una subunità facilita l'entrata delle altre e viceversa:

- $< [S]$  la V di reazione cresce lentamente
- $[S]$  intermedia, piccole aggiunte di S → grande aumento della V di reazione
- $> [S]$  la V di reazione diventa costante e = alla Vmax
- la curva da iperbole diventa perciò sigmoide

# - MIOGLOBINA ED EMOGLOBINA -

Mb → proteina di immagazzinamento di O<sub>2</sub>

Hb → proteina trasportatrice di O<sub>2</sub>

## TRASPORTO e IMMAGAZZINAMENTO di O<sub>2</sub>:

Hb e Mb: immagazzinamento e trasporto di O<sub>2</sub> → metabolismo aerobico: - assicurare apporto di O<sub>2</sub>  
- Eliminare gli scarti (CO<sub>2</sub>)

Hb: proteina trasportatrice che lega l'O<sub>2</sub> nei polmoni o branchie e lo distribuisce nei tessuti

Mb: proteina che serve ad alcuni tessuti che hanno bisogno di grandi riserve di O<sub>2</sub>

Mb → singola catena polipeptidica ripiegata attorno ad un *gruppo prostatico*: EME → sito legame O<sub>2</sub>

Hb → proteina tetramerică con le catene simili alla Mb

## MECCANISMO di LEGAME con O<sub>2</sub>:

- legare O<sub>2</sub>
- impedirne l'ossidazione
- rilasciarlo in risposta a specifiche richieste

EME

## SITO di LEGAME per O<sub>2</sub>:

- al centro di un anello tetrapirrollico detto **protoporfirina IX** → Fe<sup>2+</sup>
- il Ferro porfirinico → colore rosso del sangue

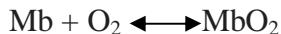
L'EME è legato non-covalentemente alla Mb o Hb accomodato in una tasca idrofobia

- il Fe → 6 ligandi: 4 con gli atomi di N; 1 con His F8 (prossimale) e 1 con His E7 (distale)
- His E7 — O<sub>2</sub> — Fe(eme) — His F8

Hb e Mb → *protezione di un metallo in grado di legare O<sub>2</sub> ma dall'ossidazione irreversibile*

## ANALISI LEGAME O<sub>2</sub> dalla Mb:

- Mb: lega O<sub>2</sub> rilasciato dall'Hb nei vasi e capillari arteriosi e la Mb lo rilascia agli organuli
- Legge di HENRY: la [ ] di un gas dissolto in un liquido è proporzionale alla P parziale di quel gas sopra al liquido → [O<sub>2</sub>] = PO<sub>2</sub>
- θ = frazione di siti di Mb legati all'O<sub>2</sub> e dipende dalla [O<sub>2</sub>] = dalla PO<sub>2</sub> dell'ossigeno libero



$$K = \frac{[MbO_2]}{[Mb][O_2]} \rightarrow [MbO_2] = K * [Mb][O_2]$$

moltiplico e divido per 1/K  
↓

$$\theta = \frac{\text{siti occupati}}{\text{totale siti disponibili}} \rightarrow \theta = \frac{[MbO_2]}{[MbO_2] + [Mb]} \rightarrow \frac{K[Mb][O_2]}{[Mb] + K[Mb][O_2]} \rightarrow \frac{K[O_2]}{1 + K[O_2]} \rightarrow \frac{[O_2]}{1/K + [O_2]} \rightarrow$$
$$\rightarrow \frac{[O_2]}{[O_2]^{1/2} + [O_2]} \rightarrow \theta = \frac{PO_2}{P_{50} + PO_2}$$

- P<sub>50</sub> bassa = alta affinità della Mb per l'O<sub>2</sub>

## TRASPORTO DI O<sub>2</sub>: Hb:

### LEGAME COOPERATIVO e ALLOSTERICIA:

Hb → accettare efficacemente O<sub>2</sub> alla PO<sub>2</sub> nei polmoni (~100 mm Hg)

→ cederne una frazione ai tessuti a PO<sub>2</sub> ~ 30-40 mm Hg

→ a < PO<sub>2</sub>: la proteina si comporta come se legasse O<sub>2</sub> molto debolmente e man mano che l'O<sub>2</sub> aumenta → > affinità → interazione cooperativa: *l'occupazione dei primi siti aumenta l'affinità all'O<sub>2</sub> per gli altri siti*

→ comunicazione reciproca tra i siti di legame → SUBUNITA' di proteina MULTIMERICA (Hb)

→ struttura tetramerică

→ lega 4 O<sub>2</sub> in 4 siti simili a Mb

→ grafico di HILL: quando l'Hb inizia a legare O<sub>2</sub> il grafico di Hill ha pendenza = 1 (bassa affinità; alta P<sub>50</sub>) e viceversa. Misura del grado di cooperatività → **coefficiente di Hill: n<sub>H</sub>**: n<sub>H</sub> → n<sub>H</sub>=1: lega in modo non cooperativo

1 < n<sub>H</sub> < n: proteina cooperativa

n<sub>H</sub>=n: completamente cooperativa

## VARIAZIONI DELLE HORMONALI ACCOMPAGNANO IL LEGAME L'UNO

**Hb** → 2 catene α e 2 catene β ( $\alpha_2\beta_2$ ); i legami + forti sono tra α e β

→ i gruppi EME sono in prossimità della superficie ma non vicini

- l'ossigenazione → una coppia α-β ruota e scivola rispetto all'altra → le catene

- la **transizione da deossiHb a ossiHb** → spiega la cooperatività del legame

#### **EFFETTI DI ALTRI LIGANDI sul COMPORTAMENTO ALLOSTERICO dell'Hb:**

- quando O<sub>2</sub> è consumato nei tessuti → CO<sub>2</sub> che deve essere allontanata e causa un abbassamento pH negli eritrociti secondo la seguente reazione:
  - CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O  $\rightleftharpoons$  HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> + H<sup>+</sup> (*anidrasi-carbonica*)
  - in deficit di O<sub>2</sub> nei muscoli → acido lattico → abbassamento pH
  - < pH in vasi e tessuti → > apporto di O<sub>2</sub> → EFFETTORI ALLOSTERICI

## **RISPOSTA ai CAMBIAMENTI di pH: l'EFFETTO BOHR:**

- caduta di pH → <affinità dell'Hb per l'O<sub>2</sub> → > rilascio delle ultime tracce di O<sub>2</sub> presente
  - **EFFETTO BOHR**
  - $\text{Hb}^*\text{4O}_2 + \text{nH}^+ \rightleftharpoons \text{Hb}^*\text{nH}^+ + 4\text{O}_2$
  - gli H<sup>+</sup> spostano l'equilibrio a destra perché promuovono il rilascio di O<sub>2</sub>
  - quando si ha ossigenazione nei polmoni → rilascio di H<sup>+</sup> → equilibrio verso sinistra inoltre gli H<sup>+</sup> liberano il bicarbonato disciolto nel sangue invertendo la reazione: la CO<sub>2</sub> può quindi essere espirata

## **IL BISFOSFOGLICERATO:**

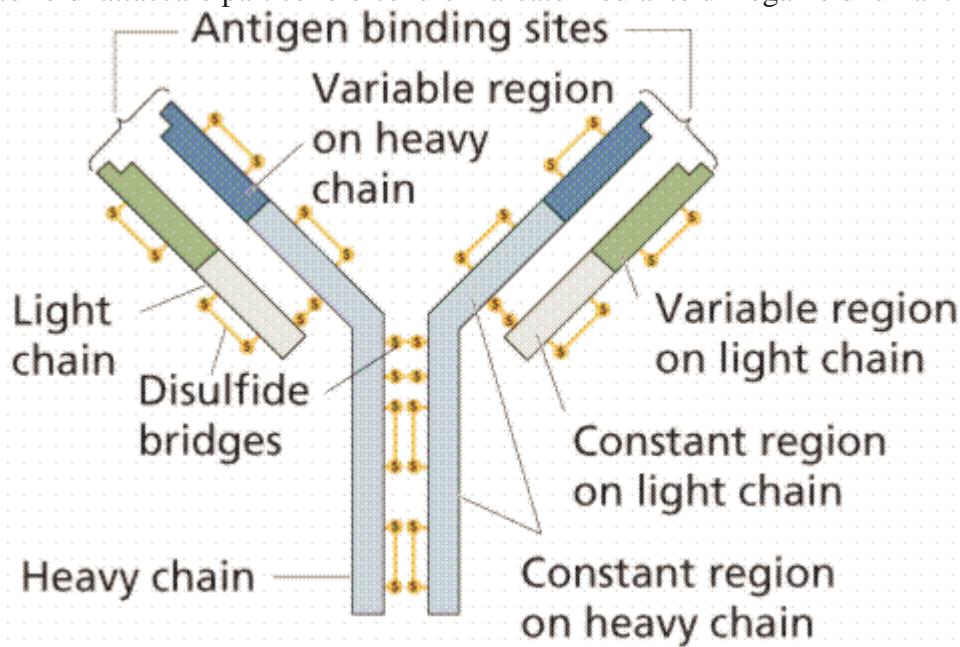
- $\text{H}^+$  e  $\text{CO}_2 \rightarrow$  effettori che facilitano lo scambio di  $\text{O}_2$  e  $\text{CO}_2$  in modo veloce nel ciclo respiratorio
  - Un altro effettore allosterico è il 2,3-BPG  $\rightarrow$  diminuisce l'affinità dell'Hb per l' $\text{O}_2$  e favorisce l'adattamento a < pressione di  $\text{O}_2$
  - Si lega nella cavità tra le catene  $\beta$  instaurando interazioni allosteriche con i gruppi +  
+ stretta nella OSSIHb  $\rightarrow$  2,3-BPG non può adattarsi
  - > contenuto di 2,3-BPG negli eritrociti  $\rightarrow$  + stabile la struttura deossiHb
  - **HbF**  $\rightarrow$  emoglobina fetale con catene  $\gamma$  ( $\alpha_2\gamma_2$ ) + affine all' $\text{O}_2$ ; < affinità per il 2,3-BPG

## IMMUNOGLOBULINE:

## **LA STRUTTURA degli ANTICORPI:**

- 2 catene pesanti e 2 leggere legate le une alle altre con ponti disolfuro

- in ogni catena → domini costanti (= in tutti gli Ab di una stessa classe) e dominio variabile (le variazioni della sequenza aa di questo dominio conferiscono agli Ab diversi tipi di specificità)
- sito di legame per l'antigene → estremità terminale dei domini variabili e coinvolge i residui aa delle regioni variabili sia delle catene pesanti che di quelle leggere
- DOMINI COSTANTI di CATENE PESANTI nella base della molecola a forma di Y servono a tenere unite le catene e fungono da effettori segnalando ai macrofagi nel sistema circolatorio di attaccare particelle o cellule marcate mediante un legame di un anticorpo.



## TEORIA DEL METABOLISMO

### La GLICOLISI:

- processo metabolico
- avviene nel cervello e tessuto nervoso, muscolo, midollare del rene, eritrociti
- nel citoplasma
- ad opera di enzimi
- l'**esokinasi** è inibita dal suo prodotto: G6P
- la **fosfofruttokinasi1** è inibita dall'ATP e dal CITRATO; l'ADP invece è stimolante
- la **piruvatokinasi** è attivata a valle se la [F1,6BP] è alta
- è meglio regolare l'enzima di una reazione irreversibile
- 10 tappe in 2 fasi (la 1° → investimento di ATP; la 2° → produzione di ATP)
- nella tappa 6 il **NAD<sup>+</sup>** viene recuperato con la **fermentazione** o con la **catena respiratoria**
- da 1 molecola di glucosio → 2 molecole di piruvato
- guadagno netto: **4 ATP**

### La DECARBOSSLAZIONE del PIRUVATO:

- eliminazione di una molecola di CO<sub>2</sub>
- enzima irreversibile: *piruvato deidrogenasi*
- utilizzo di **CoASH** → **ScoA—Acetil (Acetyl CoA)**

### Il CICLO di KREBS:

- processo metabolico
- nei mitocondri

- ad opera di enzimi
- 9 tappe
- glucosio ossidato a  $6\text{CO}_2$
- guadagno netto: **24 ATP**
- il piruvato è inibito da: **AcetilCoA; NADH; ATP**; è attivato dall'**ADP**
- l'alfa-ketoglutarato è inibito dal **NADPH** e attivato dall'**ADP**
- il succinilCoA è inibito dal **NADH**
- l'ossalacetato è inibito dal **NADH**
- le **USCITE del CICLO di KREBS** sono:
  - 1) isocitrato → acidi grassi, steroli
  - 2) alfa-ketoglutarato ↔ acido glutammico → diversi aa (x transaminazione)
  - 3) succinilCoA → eme, clorofilla
  - 4) ossalacetato ↔ aspartato (x transaminazione)

Le **REAZIONI ANAPLEURICHE** (di riempimento):

- 1) **piruvato – carbossilasica**: tramite l'enzima *piruvatocarbossilasi*. Occorre  $\text{HCO}_3^-$  + ATP e il coenzima *biotina* per legare la  $\text{CO}_2$  (grazie ad ATP) e la trasferisce sulla molecola del piruvato
- 2) **pep – carbossilasica**: tramite l'enzima *pepcarbossilasi*. Avviene solo in piante e batteri e occorre  $\text{HCO}_3^-$

La **GLUCONEOGENESI**:

- avviene nel fegato; corticale del rene (muscolo)
- i substrati sono: lattato; aa; glicerolo; acidi grassi (no x mammiferi)
- dal **piruvato → ossalacetato** tramite la *piruvatocarbossilasi*
- dall'**OAA → PEP** tramite la *pepcarbosikinasi*
- ... (= a glicolisi)
- da **F1,6BP → F6P** tramite la *fruttosio-1,6-bisfosfatasi*
- da **G6P → G** tramite la *glucosio6fosfatasi*

La **CATENA di TRASPORTO degli ELETTRONI**:

- **sistema I** → trasferire e- dal NADH al CoQ (*NADH-Q riduttasi*)
- **sistema II** → in flavoproteine: trasferire e- da  $\text{FADH}_2$  e Q
- **sistema III** → *cytocromo-riduttasi* → cytocromo C
- **sistema IV** → *cytocromo ossidasi*: gli e- arrivano sull' $\text{O}_2$
- produrre ATP da ADP + Pi
- il trasporto di e- avviene sulla cresta mitocondriale
- i sistemi sono complessi proteici che permettono il trasporto di e-
- il trasporto di e- è secondo gradiente elettrochimico ed è esoergonico
- nel sistema 1 e 2 → centri Ferro – zolfo
- i citocromi sono una classe di proteine che trasportano e- e contengono un gruppo EME
- **RAPPORTO P/O = ATP formato/ $\text{O}_2$  consumato**

La **SINTESI di ATP**:

Le creste mitocondriali sono ricche di sfere sporgenti

Nella membrana interna:

- vescicole inside – out
- consumo di  $\text{O}_2$
- ATP form

Dalle vescicole è possibile misurare il consumo di  $\text{O}_2$  e la formazione di ATP.

Se si prelevano le vescicole e si staccano le sferette → le vescicole trasportano elettroni mentre le sferette sono capaci di idrolizzare ATP se isolate. La sferetta F1 → ATP-sintetasi solo se accoppiata alla vescicola.

**Teoria chemiosmotica**: accoppiamento tra la sintesi di ATP e il trasporto di elettroni; non può esserci trasporto di elettroni (quindi consumo di  $\text{O}_2$ ) se non c'è la sintesi di ATP e viceversa.

ESPERIMENTO 1: si preparano dei mitocondri e in funzione del tempo si misura la quantità di O<sub>2</sub> consumata per cui deve essere dato un substrato respiratorio. Se i mitocondri recuperano l'ossigeno (linea in discesa) altrimenti una linea orizzontale. Se oltre al glutammato forniamo ADP + Pi, la linea scende rapidamente; quando l'ADP finisce l'andamento rallenta. Se non s'è ATP il consumo di O<sub>2</sub> è molto lento.

ESPERIMENTO 2: anziché aggiungere ADP si aggiunge il DINITROFENOLO (DNF)→il consumo di O<sub>2</sub> procede rapidamente. Il DNF è un agente disaccoppiante cioè separa il consumo di O<sub>2</sub> dalla produzione di ATP. I mitocondri se sono disaccoppiati consumano ossigeno ma non producono ATP. L'energia liberata nel trasporto di elettroni viene rilasciata.

Il DNF permette di dissipare il gradiente protonico senza che questo passi nei complessi F<sub>0</sub> e F<sub>1</sub>.

- L'accoppiamento serve per un grosso lavoro cellulare che consuma ATP e produce ADP. Se ADP è alto il trasporto di elettroni procede velocemente e si può formare molto ATP→controllo respiratorio a livello di ADP.
- **Attività intensa**→crolla ATP e aumenta ADP, stimola la respirazione cellulare.
- **Attività lenta**→poco ADP e quindi respirazione lenta; produce ATP solo se necessario.